

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE TECNOLOGIA E DESENVOLVIMENTO REGIONAL  
CURSO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**ALERSON ARAÚJO DE SOUZA**

**VIABILIDADE DE PRODUÇÃO LIPÍDICA DA MICROALGA *Coelastrum  
cambricum* UTILIZANDO MEIO DE CULTURA ALTERNATIVO E ESTRESSE  
NUTRICIONAL**

**João Pessoa**

**2017**

**ALERSON ARAUJO DE SOUZA**

**VIABILIDADE DE PRODUÇÃO LIPÍDICA DA MICROALGA *Coelastrum  
cambricum* UTILIZANDO MEIO DE CULTURA ALTERNATIVO E ESTRESSE  
NUTRICIONAL**

Trabalho apresentado como requisito  
parcial para obtenção do título de  
Tecnólogo em Alimentos pela  
Universidade Federal da Paraíba.  
Orientador: Prof. Dr. João Paulo de  
Sousa Prado  
Co orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Marta  
Maria da Conceição

**João Pessoa**

**2017**

**ALERSON ARAUJO DE SOUZA**

**VIABILIDADE DE PRODUÇÃO LIPÍDICA DA MICROALGA *Coelastrum  
cambricum* UTILIZANDO MEIO DE CULTURA ALTERNATIVO E ESTRESSE  
NUTRICIONAL**

Monografia apresentada em 30 de maio de 2017

---

Prof. Dr. João Paulo de Sousa Prado – DTA/CTDR/UFPB

Orientador

---

Prof. Dra. Marta Maria da Conceição – DTA/CTDR/UFPB

Co orientadora

---

Prof. Dr. Roberto Sassi – DBM/CCEN/UFPB

Examinador Externo

## EPÍGRAFE

### QUANTO MAIS

Quanto mais alto estejas,  
Mais apto a prestar.  
De quanto mais disponhas,  
Mais poder de servir.  
Quem possui mais cultura,  
Pode ensinar melhor.  
Não recuses doar  
Do que tenhas ou sejas.  
Virtude sem trabalho,  
Lembra riqueza morta.  
Recorda: Deus te dá,  
Para que também dês.

(Emmanuel)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por estar sempre comigo e transmitir o equilíbrio que manteve meu eixo nos momentos difíceis.

Agradeço o apoio de toda a minha família, em especial ao meu primo/irmão João de Deus, simplesmente por vir ao mundo de forma tão especial e me mostrar outro sentido na vida. Gilvandro de Souza, meu pai, pelo apoio e base que sempre me amparou. Luzia Cordeiro e Maria José, minhas avós, pelo amor sutil.

Ao papel exemplar da minha mãe, Sandra Maria, que sustentou esse sonho com o pouco de suas costuras e me ensinou que a vida não se mede em valores. *“De todo amor que eu tenho, metade foi tu que me deu. Salvando minha’lma da vida, sorrindo e fazendo o meu eu”.*

Ao amor incondicional da minha irmã, Alesandra Araújo. Meu maior exemplo como pessoa, que me inspira todos os dias e me mostra os caminhos do bem que devo percorrer, o meu porto seguro.

Minhas madrinhas, Dona Salete e Vilma Souza, pela força e apoio de sempre.

A todos os meus amigos, em especial George Lucas, Ramon da Silva, Kallina Lígia, Daniella Alves, Elayne Cristina, Deyseane Santana, Josélia Santana, Pedro Fernando, Adrielle Mayara, Vitória Gomes, Darah Sterfanny, Geovanna Lopez, Débora Cardoso pela parceria que me faz não sentir sozinho no mundo, as histórias vividas que temos para contar e os ensinamentos que me fizeram uma pessoa melhor.

A Thuilla Lopes, que mesmo sem perceber, na etapa final e mais difícil deste trabalho me trouxe alegria.

A Universidade Federal da Paraíba, ao corpo docente do campus I e III, em especial aos professores do Departamento de Tecnologia de Alimentos – CTDR/UFPB. Seus ensinamentos me fizeram um homem mais maduro e um profissional aberto ao conhecimento. Também aos servidores Diana Lima, Ricardo, Maria José, Cristina, pelo apoio incondicional.

A todos os meus orientadores, João Andrade da Silva, Marta Maria da Conceição, João Paulo de Souza Prado, pelas suas correções e incentivos. Essa conquista não seria possível sem as oportunidades concedidas, serei eternamente grato aos senhores.

Registro também, com muito carinho e admiração, o aprendizado com a minha primeira orientadora Prof.<sup>a</sup> Priscilla Diniz Bernardino, os primeiros ensinamentos jamais serão esquecidos.

Agradeço de forma muito especial ao professor Roberto Sassi e todo o aprendizado que a mim disponibilizou, aplaudo sua obra acadêmica e o ser humano que é.

Ao LARBIM e todos os seus integrantes, a professora Cristiane, Jordana, Viviane Tibúrcio, Katharina, Patrícia Moura, Patrícia Petraglia, Clediana, Evandro, Nyelson, Vânia, Viviane Barros, Luiz, Manu, Vitória, Karinne, a convivência, o respeito, serei eternamente grato por tudo o que aprendi com vocês.

Agradeço em especial a Roberta Conceição e Vilma Barboza pelo apoio sem medidas e o companheirismo em todo esse aprendizado. Vocês tornaram a caminhada mais alegre, principalmente Roberta!

Aos amigos e parceiros de curso, Aline, Nielson, Gustavo Alves, Marcia Thays, Jéssica Ferreira, Débora Marques, Rutchelly, Sulamita, Amora, Lucas Lima, Lucas Samid, Glauber, Marileide Costa, Rosário Lacerda, Ísis Meireles, Isabella Cordeiro e todos os que estiveram comigo e compartilharam um pouco do mesmo conhecimento.

Agradeço a todos que direta e indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

*Alerson Araújo de Souza*

## RESUMO

Grande parte da população de países em desenvolvimento possui carências nutricionais, principalmente em decorrência a dificuldade de acesso a dietas ricas em lipídeos saudáveis. Estudos em torno das microalgas buscam o aproveitamento nutricional de diversas espécies, principalmente para extração de matéria graxa visando à utilização como ingrediente em alimentos. O trabalho objetivou analisar a viabilidade de produção lipídica da microalga *Coelastrum cambricum* através da otimização de cultivo com meio de cultura alternativo (Biocomposto Hortifrúti) e estresse nutricional com deprivação de nitrogênio. A pesquisa foi desenvolvida com a espécie *Coelastrum cambricum*, selecionada do banco de cultura do Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia com Microalgas (LARBITM/UFPB). A espécie foi isolada do Riacho da Bica localizado no Parque Arruda Câmara da cidade de João Pessoa-PB. Os cultivos sem aplicação de estresse nutricional alcançaram valor de 218,75 UF para o cultivo em meio controle e 232,66 UF em meio alternativo durante sete dias e 299,0 UF para o cultivo em meio controle e 465,0 UF para o cultivo em meio alternativo com aplicação de estresse, os quais também apresentaram maior velocidade de crescimento (k). O rendimento máximo celular foi de  $9,25 \text{ céls.mL}^{-1} \times 10^5$  e  $14,4 \text{ céls.mL}^{-1} \times 10^5$  em meio alternativo sem e com estresse nutricional respectivamente. Os valores lipídicos foram maiores para os cultivos com estresse nutricional. Os teores lipídicos encontrados pelas metodologias gravimétricas foram maiores em relação à análise por espectrofotometria. Conclui-se que a aplicação de meios de cultivo alternativos aos meios sintéticos e estresse nutricional com deprivação de nitrogênio, são satisfatórios para o desenvolvimento fisiológico e bioquímico celular da *C. cambricum*, além de otimizar o rendimento em biomassa microalgal desta espécie. A produtividade lipídica da espécie em situações normais de cultivo é pequena, porém, o aumento nos teores lipídicos foi possível através da aplicação de meios de cultivo naturais e estresse nutricional com deprivação de nitrogênio. Sendo assim, dois métodos promissores para a redução de custos e produção sustentável de biomassa microalgal e matéria graxa através da clorofícea *C. cambricum*.

**Palavras-chave:** Clorofíceas. Lipídios. Estresse nutricional.

## ABSTRACT

A large proportion of the population of developing countries with nutritional deficiencies, mainly in difficulty of access to diets rich in healthy lipids. Studies on microalgae seek the nutritional utilization of several species, mainly for the extraction of grease to be used as an ingredient in food. The objective of this work is to analyze the viability of biomass and coagulation production through optimization of the culture with the alternative culture medium (Biocomposto Hortifrúti) and nutritional stress with nitrogen deprivation. *Coelastrum cambricum*, selected from the Culture Bank of the Laboratory of Environments Recife and Biotechnology with Microalgae (LARBIM / UFPB). Nature was isolated from the Riacho da Bica located in Parque Arruda Câmara of the city of João Pessoa-PB. UF for cultivation in the control medium and 232.66 UF in the alternative medium for seven days 299.0 UF for the cultivation in the control medium and 465.0 UF for the cultivation. In alternative medium with stress application, which also presented higher of Growth ( $k$ ). The maximum cell yield was 9.25 cells.L-1x10<sup>5</sup> and 14.4 cells.L-1x10<sup>5</sup> in alternative medium without and with nutritional stress, respectively. Lipid values were higher for cultures with nutritional stress. The lipid contents found in the gravimetric methodologies were higher in relation to the spectrophotometric analysis. It is concluded that an application of alternative culture media for synthetic media and nutritional stress with nitrogen deprivation are satisfactory for the cellular physiological and biochemical development of *C. cambricum*, besides optimizing the yield in microalgal biomass of this species. The lipid yield of the species under normal conditions of cultivation is small, however, the increase in lipid contents was approved by the application of culture media and nutritional stress with nitrogen deprivation. Thus, two promising methods for a reduction of costs and production of microalgae biomass and grease matter through chlorophyll *C. cambricum*.

**Keywords:** Chlorophyceae. Lipids. Nutritional stress.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fotografias da espécie <i>Coelastrum cambricum</i> selecionada para desenvolvimento do estudo .....	17
Figura 2: Tanques de cultivo de microalgas do tipo “raceway” .....	18
Figura 3: Exemplo de um fotobiorreator tubular utilizado em cultivos em massa de microalgas .....	19
Figura 4: Cultivo da microalga <i>Coelastrum cambricum</i> em fotobiorreatores de escala laboratorial no início da fase de crescimento celular.....	25
Figura 5: Cultivo da microalga <i>Coelastrum cambricum</i> em fotobiorreatores de escala laboratorial próximo a fase final de cultivo em condições de estresse nutricional .....	25
Figura 6: Curvas de crescimento celular da espécie estudada em biocomposto hortifrúti e meio controle .....	29

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Composição do meio alternativo com biocomposto hortifrúti .....	28
Quadro 2: Composição do meio sintético WC (GUILLARD, 1972) .....	29

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros cinéticos de crescimento celular .....	31
Tabela 2: Produtividade lipídica da microalga <i>Coelastrum cambricum</i> através dos métodos de Folch <i>et. al.</i> (1957); Bligh e Dyer (1959) e Mishra <i>et. al.</i> (2014) .....	32

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
<b>2.1 OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>15</b>
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>16</b>
<b>3.1 MICROALGAS .....</b>	<b>16</b>
<b>3.2 Coelastrum cambricum.....</b>	<b>17</b>
<b>3.3. CULTIVO DE MICROALGAS .....</b>	<b>19</b>
<b>3.4. APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DAS MICROALGAS .....</b>	<b>20</b>
<b>3.5. MICROALGAS NA ALIMENTAÇÃO HUMANA E ANIMAL .....</b>	<b>22</b>
3.5.1 Lipídeos de microalgas na alimentação humana e animal .....	23
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
<b>4.1 CARACTERIZAÇÃO DA PESQUISA.....</b>	<b>25</b>
<b>4.2 CULTIVO DA <i>Coelastrum cambricum</i> .....</b>	<b>25</b>
<b>4.3. MEIOS DE CULTIVO .....</b>	<b>27</b>
4.3.1 Meio Alternativo Biocomposto Hortifrúti .....	27
4.3.2. Meio Sintético WC (GUILLARD, 1972) .....	28
<b>4.4 ESTRESSE NUTRICIONAL.....</b>	<b>28</b>
<b>4.5 ANÁLISE DE LIPÍDIOS POR MÉTODOS GRAVIMÉTRICOS .....</b>	<b>29</b>
<b>4.6 ANÁLISE DE LIPÍDIOS POR ESPECTROFOTOMETRIA .....</b>	<b>29</b>
<b>4.7 ANÁLISE DE DADOS .....</b>	<b>30</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>31</b>
<b>5.1 CURVA DE CRESCIMENTO CELULAR POR ANÁLISE DE FLUORESCÊNCIA .....</b>	<b>31</b>
<b>5.2 CINÉTICA DE CRESCIMENTO CELULAR E VIABILIDADE LIPÍDICA.....</b>	<b>32</b>
5.2.1. Parâmetros cinéticos de crescimento.....	32
5.2.2 Produtividade lipídica .....	33
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>35</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....</b>	<b>36</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Considerável parte da população mundial, principalmente de países subdesenvolvidos, enfrenta grande dificuldade de acesso a uma alimentação rica em nutrientes essenciais, aumentando cada vez mais os índices de doenças e desnutrição. Um exemplo recorrente é a dificuldade de acesso a dietas ricas em ácidos graxos poli-insaturados, ômega-3 e ômega-6 (GARÓFOLO *et al.*, MARTIN *et al.*, 2006; PERINI *et al.*, 2010; SUAREZ *et al.*, 2002). Diante disto, pesquisas vêm sendo realizadas com o intuito de viabilizar a utilização de nutrientes de matérias primas com potenciais biotecnológicos.

Microalgas são capazes de incrementar o conteúdo nutricional de alimentos convencionais, podendo contribuir positivamente a saúde humana. A utilização de microalgas na alimentação humana ocorre há séculos, tendo sido usadas por tribos indígenas do Chaad e pelos Astecas, que as secavam em lamelas para serem ingeridas como fonte de nutrientes (DERNER *et al.*, 2006; DRUZIAN; MENDONÇA; NUNES, 2012). Quando cultivadas em meios adequados certas espécies de microalgas podem duplicar a sua biomassa diariamente e alcançar produtividades de 30 a 50 g.m<sup>-2</sup>.dia<sup>-1</sup> em peso seco. Esta característica, aliada à simplicidade nas técnicas de cultivo, torna as microalgas um dos objetos de pesquisa prioritários das mais modernas áreas de investigação (BENEMANN *et al.*, 1987; GOLDMAN, 1980; NAVALHO, 1998).

Os cultivos podem ser desenvolvidos com meios alternativos preparados a partir de resíduos de processos industriais e adição de CO<sub>2</sub> (cultivos autotróficos) ou resíduos orgânicos (cultivos heterotróficos) (PITTMAN *et al.* 2011). Quando se trata de meio de cultura sintético, o alto custo dos nutrientes pode representar fator limitante para a produção (DUARTE, 2001).

Tanto no ambiente natural quanto nos cultivos, o crescimento de uma população de microalgas é resultado da interação entre fatores biológicos, físicos e químicos (MOHEIMANI, 2005). Em condições ambientais extremas ou estresse induzido durante o cultivo, as microalgas podem potencializar a síntese de alguns compostos. As respostas das células a essas condições ambientais definem esses fatores como limitantes ou otimizantes (MOHEIMANI, 2005; PELIZER *et al.*, 2006).

Nos fatores físico-químicos os mais observados são a luz (DARLEY, 1982), a temperatura (COLLA *et. al.*, 2007), a quantidade e o tipo de aeração (CONVERTI *et. al.*, 2006; ONCEL; SUKAN, 2007), a disponibilidade de nutrientes (GUILLARD, 1975), a salinidade (LOURENÇO; MARQUES JUNIOR, 2002) e o pH (LOURENÇO, 2006). A manipulação de nutrientes como o nitrogênio no meio de cultura, por exemplo, exerce uma forte influência no metabolismo de lipídios e ácidos graxos em espécies de microalgas (TAKAGI *et. al.*, 2006).

O aumento da produtividade da biomassa para obtenção de ácidos graxos insaturados vem despertando o interesse dos produtores, principalmente como fonte de  $\omega$ -3 (COHEN, NORMAN e HEIMER, 1995). O teor de ácidos graxos poli-insaturados produzidos pela microalga pode ser determinado pela espécie cultivada, concentração dos nutrientes do meio de cultura, fluxo de aeração, luminosidade, tempo do fotoperíodo e a temperatura do cultivo (LOURENÇO, 1996; TORRES, 1994). As microalgas podem produzir até 30 vezes mais óleo do que a soja por unidade de área com destaque para a composição dos ácidos graxos presentes nesses microrganismos, na sua maioria insaturados (SKJAK-BRAEK, 1992).

O cultivo de microalgas para extração de óleo é vantajoso por apresentar elevada taxa de crescimento, fácil adaptação em meios alternativos a base de resíduos agroindustriais, além de possibilitar produção o ano inteiro e um curto ciclo de vida (BERTOLDI, 2008). Usualmente, os teores de lipídios em microalgas são determinados por métodos gravimétricos após extração com solvente, o que requer tempo considerável e grande quantidade de biomassa seca. Um método que vem se mostrando promissor em relação à economia de biomassa e reagentes, é através de técnicas de marcação empregando espectrofluorescência (GOVENDER *et. al.*, 2012).

Entretanto, ainda não está bem definido na literatura, os parâmetros que comprovam a eficácia das espécies de microalgas em questão. O presente trabalho partiu da hipótese de que a microalga *Coelastrum cambricum* é uma matéria prima com grande potencial de produção de óleo para utilização em alimentos com técnicas menos impactantes para o meio ambiente e elevada eficiência de produção, além de possuir naturalmente lipídios com elevado padrão de qualidade.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a viabilidade de produção lipídica da microalga *Coelastrum cambricum* através da otimização de cultivo com meio de cultura alternativo utilizando biocomposto hortifrúti e estresse nutricional com deprivação de nitrogênio.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar a cinética de crescimento celular e produção de biomassa unialgal da espécie *Coelastrum cambricum* cultivada em meio sintético e em meio alternativo utilizando biocomposto hortifrúti.
- b) Avaliar a produtividade lipídica dos cultivos antes e após aplicação de estresse nutricional com deprivação de nitrogênio, comparando os principais métodos de determinação de lipídios totais em microalgas.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 MICROALGAS

As microalgas são organismos unicelulares, coloniais ou filamentosos que estão presentes principalmente nos ambientes aquáticos. Possuem uma composição bioquímica diversificada, relacionada à natureza de cada espécie, aos fatores ambientais de acordo com a região onde o cultivo está sendo realizado, às condições de cultivo e ao meio de cultura utilizado (LEE, 2008; MATA *et. al.*, 2010).

Esses microrganismos são algumas das mais antigas formas de vida na terra, mas só recentemente foram reconhecidos como uma fonte muito promissora de biomassa. Elas produzem mais biomassa do que plantas terrestres por unidade de área, pois possuem uma maior eficiência fotossintética (LARDON *et. al.*, 2009). Têm a capacidade de produzir mais oxigênio do que todas as plantas do mundo (RODOLFI *et. al.*, 2009).

Os relatos mais antigos de usos de microalgas pelo homem remetem à China, quando há 2000 anos, em tempos de alimento escasso, alguns grupos consumiam a cianobactéria filamentosa *Nostoc* (SPOLAORE *et. al.*, 2006). Sabe-se também do uso, há muitos séculos, de diferentes espécies de *Spirulina* como alimento, consistindo na coleta em lagos de massas flutuantes de filamentos que após a secagem assumiam consistência endurecida; essas preparações eram chamadas de tecuitlatl, por indígenas nativos do México, e de dihé, por populações do noroeste da África (DERNER *et. al.*, 2006; DRUZIAN; MENDONÇA; NUNES, 2012; LOURENÇO, 2006; NORTON *et. al.*, 1996). Contudo, esses exemplos são exceções quanto ao uso de microalgas pelo homem. A produção comercial de microalgas intensificou-se somente após a Segunda Guerra Mundial e, em especial, após a grande crise do petróleo nos anos 1970 (LOURENÇO, 2006).

As microalgas destacam-se principalmente por apresentarem elevado valor proteico (50-70%), aminoácidos essenciais, vitaminas (especialmente B12), sais minerais, além de pigmentos (carotenoides, ficocianinas e clorofilas), ácidos graxos poli-insaturados, incluindo os ácidos graxos ômega-3 e outros compostos biologicamente ativos (AARONSON; BERNER; DUBINSKY, 1980; BOROWITZKA, 1999a, 1999b; COLLA *et. al.*, 2007). Por causa dessas propriedades nutricionais,



esses microrganismos podem ser empregados especialmente no desenvolvimento de alimentos funcionais (AMBROSI *et. al.*, 2008).

Há algumas décadas, as características de crescimento rápido e de elevada produtividade vêm estimulando pesquisas sobre o aproveitamento de biomassa microalgácea como recurso renovável valioso de geração de produtos e renda, além de viabilizarem a implantação de diversos empreendimentos comerciais (ANDRADE; COSTA, 2008; CHAUMONT, 1993; LOURENÇO, 2006).

A utilização de microalgas compreende formas mais simples e convencionais de produção de biomassa algácea em certas aplicações, mas outros usos podem envolver processos e equipamentos bem mais complexos, caracterizando a atividade como uma forma moderna de produção biotecnológica (CHISTI, 2007). Atualmente, numerosas aplicações comerciais são reconhecidas para microalgas, as quais podem ser classificadas em três categorias básicas (i) uso de microalgas para aumentar o valor nutricional de alimentos para o homem e para animais, agregando propriedades a sua composição química; (ii) uso de microalgas in natura ou parcialmente processadas como alimento de animais, em aquicultura, (iii) utilização de moléculas de alto valor agregado (por exemplo, pigmentos e ácidos graxos), produzidas por microalgas, em alimentos industrializados, produtos farmacêuticos e cosméticos, por exemplo (LOURENÇO, 2006).

### 3.2 *Coelastrum cambricum*

As algas do filo *Chlorophyta*, também conhecidas como algas verdes, são eucariontes fotoautotróficas, podendo ser encontradas em todos os níveis de organização, desde formas flageladas, cocóides até espécies de estrutura talosa. Alguns organismos apresentam flagelos, em número variável, os quais permitem o movimento ativo destes no meio. Nas células flageladas encontram-se ainda manchas oculares (estigma) as quais se apresentam como organelas de coloração vermelha ou parda, que conferem a capacidade de perceber a intensidade e direção luminosa (ALGAEBASE, 2017).

A espécie *Coelastrum cambricum* caracteriza-se como um cenóbio esférico com 16 células, cada célula se une a célula vizinha por seus lados; possuindo

projeções curtas, truncadas nos ápices das células; cloroplasto com um pirenoide e células de 5,22-10,44  $\mu\text{m}$  de diâmetro (FELISBERTO *et. al.*, 2008).

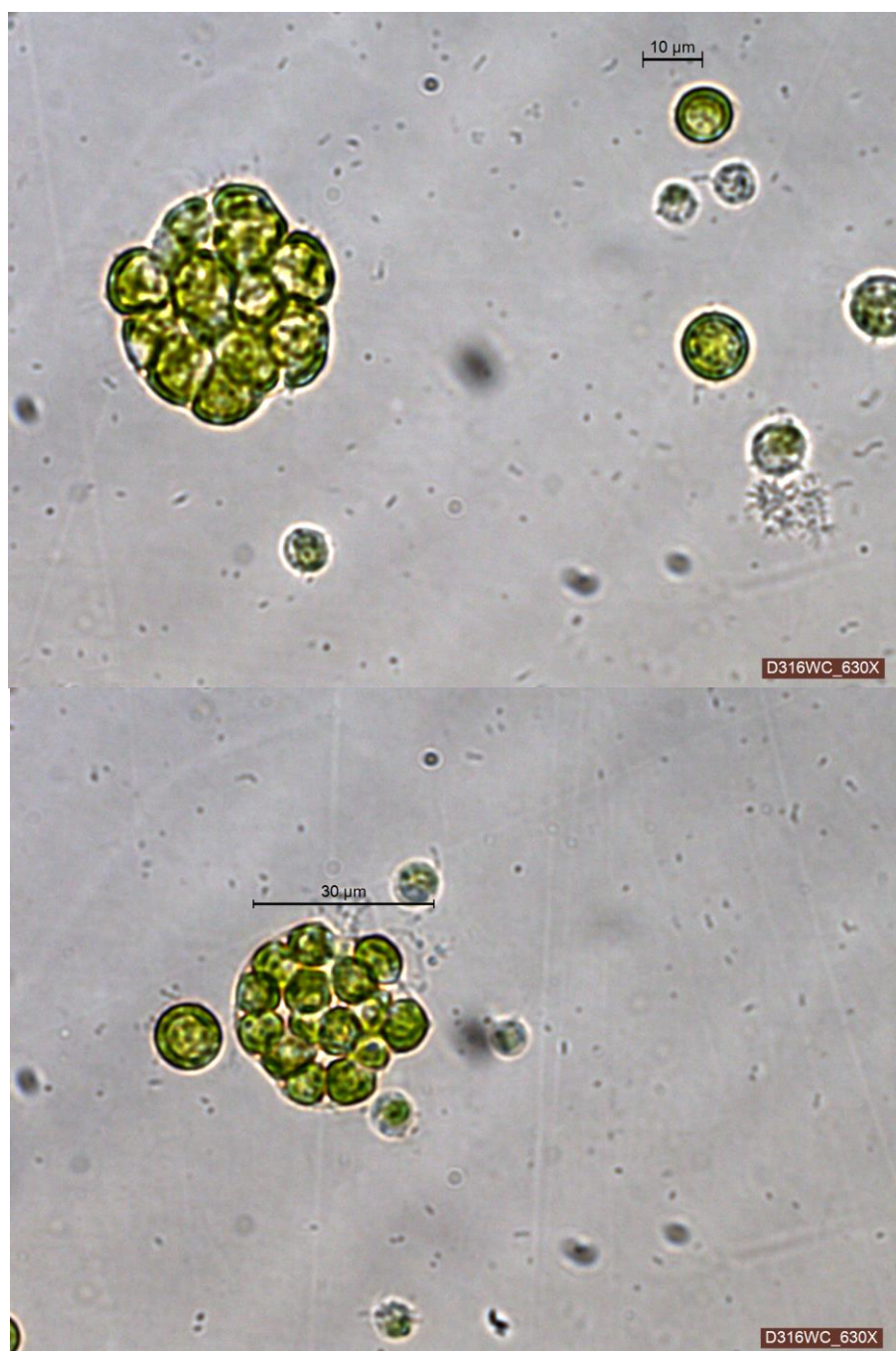


Figura 1: Fotografias da espécie *Coelastrum cambricum* selecionada para desenvolvimento do estudo. Fonte: LARBIM, 2017.

### 3.3. CULTIVO DE MICROALGAS

As primeiras pesquisas a respeito do cultivo de microalgas foram influenciadas pelas descobertas no campo da fisiologia vegetal, os quais demonstraram que os vegetais adquirem seus nutrientes a partir de uma mistura de componentes minerais. Além disso, as condições de cultivo de microalgas podem ser alteradas para induzir a produção de maiores concentrações de substâncias de interesse para uma determinada finalidade, como ácidos graxos e outros componentes (MARTINS, 2014).

Um dos principais problemas relativos à produção de biomassa algácea em sistemas grandes é o custo do meio de cultura. Assim, estudos de meio de culturas que conciliem baixo custo e respostas adequadas de crescimento e composição química são sempre desenvolvidos, pois muitas vezes é necessário obter dados específicos e locais (NASCIMENTO *et. al.*, 2013; SILVA *et. al.*, 2014).

Os sistemas abertos são os mais utilizados devido a sua fácil acessibilidade. São sistemas formados por lagoas rasas expostas ao sol ou em estufas, com dois formatos:

- Tipo *raceway*: Normalmente utilizados nos cultivos comerciais, possuindo boa capacidade de mistura pois contêm pás circulares, bombas ou defletores para circulação de nutrientes, gases e da cultura algal, garantindo boas taxas de crescimento das microalgas, (Figura 2);

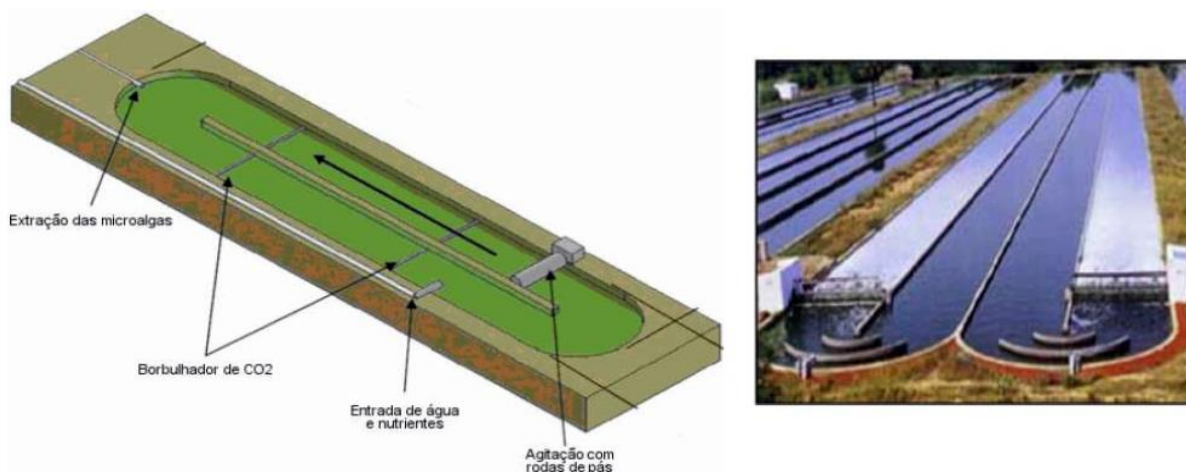


Figura 2: Tanques de cultivo de microalgas do tipo “raceway”. Fonte: PÉREZ, 2007.

- Tipo *fotobiorreator*: Um fotobiorreator (Figura 2) é basicamente um biorreator que incorpora alguma fonte de luz podendo ser construídos de diferentes formatos, como por exemplo, tubular, em placa, cônico, em placas horizontais ou verticais, em coluna de bolhas, tanques com agitação e agitação pneumática (DASGUPTA *et. al.*, 2010). Entretanto, cada tipo de fotobiorreator apresenta vantagens e desvantagens que precisam ser levadas em consideração no momento de sua construção e utilização.

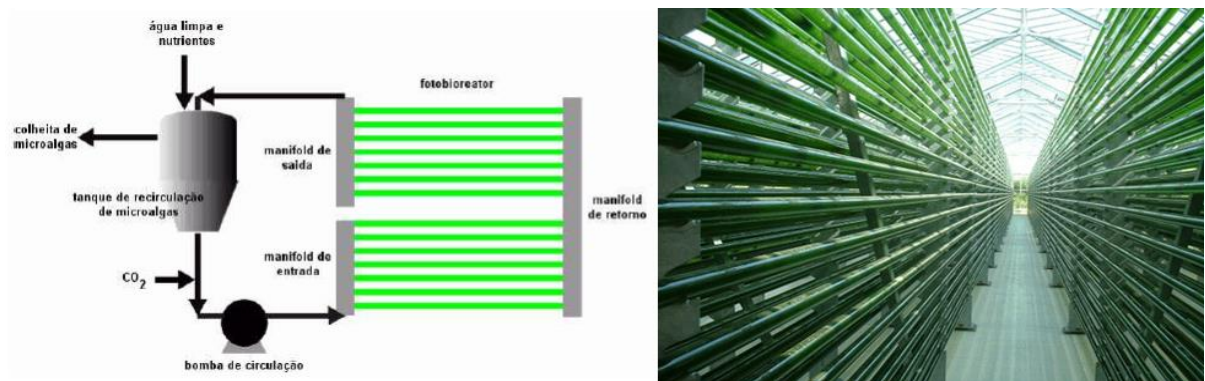


Figura 3: Exemplo de um fotobiorreator tubular utilizado em cultivos em massa de microalgas. Fonte: PÉREZ, 2007.

### 3.4. APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DAS MICROALGAS

O cultivo de microalgas permite a obtenção de diversos compostos de interesse biotecnológico para indústria alimentícia, farmacêutica, e cosmética, além disso, as condições de cultivo podem ser alteradas induzindo um maior acúmulo do produto de interesse, por exemplo: pigmento, proteína, carboidrato ou ácidos graxos. Vale ressaltar que uma mesma espécie pode apresentar diferentes perfis químicos de acordo com as condições em que foi cultivada, devido à flexibilidade que as microalgas possuem diante dos substratos que conseguem assimilar, variando consideravelmente os diversos produtos resultantes do seu metabolismo (CAETANO, 2010; LOURENÇO, 2006; MATA; MARTINS).

A utilização mais comum das microalgas é voltada para suplementação humana e animal, sendo o único uso até os anos 1940. As microalgas são utilizadas

na alimentação direta ou indireta de espécies de peixes, crustáceos e outros organismos de interesse econômico, podendo se destacar o uso dos gêneros de microalgas *Arthrospira*, *Chlorella*, *Scenedesmus* e *Dunaliella* (DERNER *et. al.*, 2006; LOURENÇO, 2006; YAAKOB *et. al.*, 2014).

Algumas algas podem ser utilizadas na recuperação de sistemas aquáticos, principalmente quando envolve íons metálicos e alguns compostos orgânicos, já que conseguem retirar esses elementos químicos do meio aquoso (VIDOTTI e ROLLEMBERG, 2004). Há também a possibilidade de uso das microalgas como bioindicadores de poluição orgânica em corpos d'água, pelo estudo da abundância relativa e riqueza das espécies, assim como pela formação de florações (YUCRA E TAPIA, 2008).

Já foi confirmado que aves que foram suplementadas nutricionalmente com microalgas, produziram ovos com casca mais forte, diminuindo as perdas durante o seu transporte. Porém, a utilização de microalgas como enriquecimento nutricional esbarra no obstáculo do custo envolvido na obtenção da biomassa seca, mesmo que o produtor aumente seus lucros no produto final vendido, devendo-se procurar maneiras de baratear tal custo (VITTA, 2014).

A produção comercial de microalgas teve início na década de 60 com espécies de *Chlorella* e *Spirulina*, como suplementos dietéticos, *Dunaliella salina* para obtenção de B-caroteno, *Haematococcus pluvialis* para produção de astaxantina e diversas outras espécies para aplicação na aquicultura. Nessa mesma década, as pesquisas em biotecnologia de microalgas concentravam-se na reciclagem de águas residuais, sua aplicação em programas espaciais de renovação atmosférica e fonte de alimento (BENEMAN, 1990; LOURENÇO, 2006).

As microalgas também são estudadas para a produção de biocombustíveis, como o biodiesel, o bioetanol, biogás, bioquerosene e Bio-hidrogênio e ultimamente a maioria das pesquisas têm sido orientadas ao desenvolvimento de métodos de cultivo e engenharia de sistemas de cultivo, engenharia genética e metabólica, a fim de aumentar a produção lipídica, medidas eficientes de colheita de biomassa, avaliação de custo-eficácia e avaliação do ciclo de vida (GHOSH *et. al.*, 2016; GONÇALVES; PIRES; SIMÕES, 2016; SAWAENGSAK *et. al.*, 2014; TERCERO; DOMENICALI; BERTUCCO, 2014; ZHU, 2015).

As microalgas, sob o ponto de vista biotecnológico, não constituem grupo de microrganismos muito estudado. Dentre as dez mil espécies de microalgas que se acredita existirem, pouco mais de mil linhagens são mantidas em coleções ao redor do mundo, apenas algumas centenas foram investigadas por seu conteúdo químico e somente pequena quantidade tem sido cultivada em escala industrial. Por serem pouco exploradas, representam rica oportunidade para novas descobertas (OLAIZOLA, 2003; ZAHNER e FIEDLER, 1995).

### 3.5. MICROALGAS NA ALIMENTAÇÃO HUMANA E ANIMAL

A dieta está diretamente ligada com a saúde dos seres humanos, e sabe-se que os alimentos contêm alguns componentes (vitaminas, minerais, polifenóis e micronutrientes tais como ácidos graxos  $\omega$ -3) que são os 18 responsáveis pela manutenção ou promoção da saúde e bem-estar (OLIVEIRA, 2008). A procura por novas fontes destes compostos impulsionou a pesquisa para o aprofundamento na área de caracterização e extração destes compostos bioativos (antioxidantes, antitumorais, antivirais, etc.). As algas apresentam-se como uma nova fonte praticamente ilimitada de ingredientes funcionais não pela presença de um composto em particular, mas pela sua ampla diversidade e possibilidade de cultivo em diferentes condições o que pode levar ao enriquecimento de alguns compostos bioativos (PLAZA *et. al.*, 2010).

Estes ingredientes bioativos, ou nutracêuticos, capazes de melhorar a saúde do indivíduo são conhecidos como ingredientes funcionais, e podem de acordo com as últimas pesquisas, estarem presentes em micro e macroalgas, o que as tornaria, novas fontes naturais destes compostos podendo seus compostos serem extraídos para formulação de alimentos funcionais ou suplementos (HERRERO *et. al.*, 2006; PLAZA *et. al.*, 2008; ZUBIA *et. al.*, 2009).

Por definição, alimento funcional é aquele que contém um ou mais ingredientes funcionais que estão ausentes no alimento similar convencional, ou em concentrações mais baixas. Suplementos alimentares são aqueles comercializados em pílulas ou tabletes, que contêm esses ingredientes capazes de melhorar a saúde. No contexto de formulação de alimentos funcionais ou suplementos,



preferem-se fontes naturais, como plantas e algas, aos compostos sintéticos (PLAZA, *et. al.*, 2008; ZUBIA *et. al.*, 2009).

Além da consolidada produção para a obtenção de biomassa, diversas microalgas têm sido cultivadas por sua capacidade de sintetizar compostos considerados nutracêuticos, tais como os ácidos graxos poli-insaturados (ácido araquidônico - ARA, ácido eicosapentaenoico – EPA e ácido docosahexaenóico - DHA, por exemplo) e pigmentos carotenoides (astaxantina, betacaroteno, luteína, cantaxantina etc.), que apresentam propriedades terapêuticas (DERNER *et. al.*, 2006).

As principais formas de inserção das microalgas na alimentação humana são os suplementos alimentares (formulações em pó, tabletes, capsulas ou extratos), podendo também ser incorporadas em massas, *snacks*, chocolates ou gomas e bebidas. As principais espécies utilizadas para estes fins são *Arthrospira*, *Chlorella sp.*, *Dunaliella salina* e *Aphanizomenon flos-aquae* (DERNER *et. al.*, 2006; PULZ e GROSS, 2004).

### 3.5.1 Lipídeos de microalgas na alimentação humana e animal

Os lipídeos presentes nas microalgas são compostos de glicerol, açúcares ou bases esterificadas em ácidos graxos saturados e insaturados (LOURENÇO, 2006; VIDOTTI E ROLLEMBERG, 2004).

Algumas espécies de microalgas se destacam por produzirem altas concentrações de óleo que podem chegar até 75% em peso em relação à biomassa seca, a exemplo da clorofícea *Botryococcus braunii* (MATA *et. al.*, 2009). A soja, uma das plantas oleaginosas muito utilizada na produção de alimentos e energia, contém cerca de 18% de óleo no grão. Algumas espécies de microalgas que produzem quantidades de óleo próximo ou superior à soja, incluem *Scenedesmus obliquus* (12-14%), *Scenedesmus dimorphus* (16-40%), *Prymnesium parvum* (22-38%), *Chlamydomonas reinhardtii* (21%), *Chlorella vulgaris* (14-22%), *Spirogyra sp.* (11-21%), e *Dunaliella tertiolecta* (64-71%) (TEIXEIRA; MORAES, 2007).

A produção de biomassa a partir de microalgas pode atingir de 15-25 toneladas/há/ano e a estimativa para a produção de lipídios é de 4,5-7,5 toneladas/há/ano. Em comparação com as oleaginosas geralmente utilizadas para

extração de óleo, claramente vê-se um potencial na produção de óleo para o ramo alimentar a partir de microalgas, uma vez que a soja produz 0,4 tonelada/há/ano (CHISTI, 2007; LAM; LEE, 2011, 2012).

Chisti (2008), entretanto, ressalta que o conteúdo de óleo nas microalgas pode exceder 80% da biomassa seca, contrastando com muitas plantas oleaginosas que contém quantidade de óleo reduzida quando comparada às microalgas, sendo a produção atual de óleo das oleaginosas insuficiente para atender à demanda.

Microalgas têm recebido maior atenção nos últimos anos principalmente pelo seu conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados e outros compostos de alto valor biotecnológico (GARDEVA *et. al.*, 2009; HERRERO *et. al.*, 2006; MATSUI *et. al.*, 2003; PLAZA *et. al.*, 2010).

Dentre os ácidos graxos presentes nas microalgas, os da família ômega 3 ( $\omega$ -6) são particularmente importantes, já que estão relacionados com a diminuição dos teores de colesterol e não são produzidos pelo organismo humano, sendo considerados ácidos graxos essenciais (COQUEIRO, BUENO E SIMÕES, 2011; SILVA, 2008).

Os ácidos graxos de cadeia longa, eicosapentanóico (EPA), docosahexaenóico (DHA) e araquidônico (AA) são de especial interesse por apresentarem alto valor nutricional. O DHA é um componente estrutural abundante na massa do cérebro e na retina dos olhos, além de compor o tecido cardíaco, e ser considerado eficiente no tratamento da infertilidade masculina associada ao dano de membrana e do DNA espermático, logo já está sendo produzido comercialmente em grandes quantidades (ÁLVAREZ, 2011; LOURENÇO, 2006).

Os ácidos graxos poli-insaturados (PUFA)  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6 são amplamente estudados, principalmente no que se refere ao enriquecimento nutricional (LEMALE; PALACIOS, *et. al.*, 2014) visando à prevenção e tratamento de diversas doenças (ÁLVAREZ, 2011; FERNÁNDEZ *et. al.*, 2011). Estas duas famílias de ácidos devem estar em equilíbrio na dieta, já que os teores de  $\omega$ -6 são influenciados pelos teores de  $\omega$ -3. Já se tem relatado que a ingestão de ômega-3 beneficia o organismo humano devido sua ação anti-inflamatória em processos degenerativos (ex. artrite reumática) e nos quadros inflamatórios após atividades físicas intensas (COQUEIRO, BUENO E SIMÕES, 2011).



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DA PESQUISA

A pesquisa foi desenvolvida com a espécie *Coelastrum cambricum*, selecionada do banco de cultura do Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia com Microalgas (LARBIM/UFPB). Ensaios prévios evidenciaram que a espécie apresenta excelente crescimento em meio alternativo formulado a partir de biocomposto hortifrúti, razão pela qual foi selecionada para este estudo. A espécie foi isolada do Riacho da Bica localizado no Parque Arruda Câmara da cidade de João Pessoa-PB, codificada no banco de cultura do LARBIM/UFPB como D316 e mantida em meio WC.

### 4.2 CULTIVO DA *Coelastrum cambricum*

Os cultivos foram realizados em bancada, em sala de cultura climatizada, com temperatura mantida em  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ , sistema de iluminação fornecido por lâmpadas fluorescentes tipo luz-do-dia, e fotoperíodo de 12 horas, com aeração por injeção contínua de ar atmosférico ( $2\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ) usando um minicompressor de membrana Resun AOC2. Os meios de cultura utilizados foram o sintético e alternativo em balões com capacidade para 6 litros e em triplicata. O desenvolvimento dos cultivos foi acompanhado por contagens celulares em câmaras *Fuchs-Rosenthal* em microscópio binocular Leica e através de análises da fluorescência *in vivo* das amostras utilizando um fluorômetro Turner Design 10005R para a determinação das curvas de crescimento. Metade do cultivo de cada balão foi interrompido na fase estacionária e à outra metade foram reconstituídos os meios sintético e alternativo, mas com deprivação de nitrogênio sofrendo estresse nutricional durante três dias adicionais ao cultivo. A biomassa produzida, após interrupção, foi concentrada em centrifuga refrigerada a  $18^{\circ}\text{C}$ , congelada em ultra freezer ( $-30^{\circ}\text{C}$ ), liofilizada e pesada. O mesmo processo de concentração e secagem de biomassa unialgal foi repetido para a outra metade do cultivo de cada balão após os três dias de aplicação de estresse nutricional. Três análises quantitativas foram realizadas para determinação dos lipídios totais, a análise de Mishra *et. al.* (2014) por Fosfo-Vanilina

determinou os lipídios totais por espectrofotometria utilizando 1 mg de biomassa liofilizada e os métodos de Folch *et. al.* (1957) e Bligh e Dyer (1959) por gravimetria utilizando 50 mg de biomassa como amostra. Os resultados foram submetidos à análise de variância Two Way (ANOVA), seguido de comparações múltiplas de Tukey ( $p < 0,05$ ) com o auxílio do software estatístico GraphPad Prism 7.03.



Figura 4: Cultivo da microalga *Coelastrum cambricum* em fotobiorreatores de escala laboratorial no início da fase de crescimento celular. Fonte: LARBIM, 2017.

As curvas de crescimento celular por fluorescência foram traçadas para as duas condições experimentais, comparando-se o rendimento máximo em biomassa. Dados das contagens celulares por meio de câmara *Fuchs-Rosenthal* em microscópio binocular Leica foram analisados e utilizados para cálculo e determinação do rendimento máximo em número de células e a produtividade diária de biomassa ( $\text{g.L}^{-1} \cdot \text{Dia}^{-1}$ ) que se refere ao número de divisões celulares da espécie por unidade de tempo ( $k$ ), conforme proposto por Stein (1973).



Figura 5: Cultivo da microalga *Coelastrum cambricum* em fotobiorreatores de escala laboratorial próximo a fase final de cultivo em condições de estresse nutricional. Fonte: LARBIM, 2017.

### 4.3. MEIOS DE CULTIVO

#### 4.3.1 Meio Alternativo Biocomposto Hortifrúti

O substrato utilizado como meio de cultivo alternativo foi obtido a partir da compostagem de hortifrúti realizada na Empresa Paraibana de Abastecimento e Serviços Agrícolas - EMPASA, localizada na cidade de João Pessoa – PB. O material foi transportado ao Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia com Microalgas da Universidade Federal da Paraíba (LARBIM/UFPB), onde o substrato foi diluído em água, autoclavado e filtrado. O resíduo sólido foi descartado e o filtrado foi novamente autoclavado para utilização na composição do meio de cultivo (Quadro 1).

Quadro 1: Composição do meio alternativo com biocomposto hortifrúti

Solução estoque	Fórmula	Quantidade
Nitrato de sódio	$\text{NaNO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	200 g/L
Fosfato de sódio	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	4 g/L
Extrato de solo	- - -	1 kg/L
Água – 950 mL Extrato de solo – 30 mL/L	Solução Estoque Nitrato–1 mL/L Solução Estoque Fosfato–1 mL/L	

#### 4.3.2. Meio Sintético WC (GUILLARD, 1972)

O meio WC sintético foi composto por reagentes próprios do Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia com Microalgas – LARBIM/UFPB, a partir da formulação do Quadro 2.

Quadro 2: Composição do meio sintético WC (GUILLARD, 1972)

SOLUÇÃO ESTOQUE	FÓRMULA	QUANTIDADE
Cloreto de cálcio 2.H2O	CaCl2. 2H2O	36.8 g
Sulfato de magnésio 7.H2O	MgSO4. 7H2O	37 g
Bicarbonato de sódio	NaHCO3	12.6 g
Fosfato de potássio 3.H2O	K2HPO4.3H2O	11.4 g
Nitrato de sódio	NaNO3	85 g
Água destilada	1 L	
Solução de silicato	Fórmula	Quantidade
Metasilicato de sódio 9.H2O	Na2SiO3.9H2O	21.2 g
Água destilada	1 L	
Solução de micronutrients	Fórmula	Quantidade
Sal dissódico	Na2EDTA	4.36 g
Cloreto férrico 6.H2O	FeCl3. 6H2O	3.15 g
Sulfato de cobre 5.H2O	CuSO4. 5H2O	0.01 g
Sulfato de zinco 7.H2O	ZnSO4.7H2O	0.022 g
Cloreto de cobalto 6.H2O	CoCl2. 6H2O	0.01 g
Cloreto de manganês 4.H2O	MnCl2. 4H2O	0.18 g
Molibdato de sódio 2.H2O	Na2MoO4.2H2O	0.006 g
Ácido bórico	H3BO3	1 g
Água destilada	1 L	Solução estoque, Solução de silicato, Solução de micronutrientes e Solução de vitaminas: usar 1mL a cada litro de meio.
Solução de vitaminas	Quantidade	
Tiamina HCl	0.1	
Biotina	0.0005	
Água destilada	1 L	
Tri(hidroximetil)-amino metano	0.115 g a cada litro de meio	

#### 4.4 ESTRESSE NUTRICIONAL

Metade do cultivo em cada balão foi interrompido no sétimo dia de cultivo, após a interrupção, os balões com o cultivo foram mantidos sob refrigeração. A obtenção da biomassa unialgal foi realizada através de processo de centrifugação, congelamento da biomassa fresca e liofilização. A outra metade dos cultivos de cada balão continuou sob condições de crescimento, sendo imediatamente submetidas a

estresse nutricional através da reconstituição dos meios sintético e alternativo nos respectivos cultivos, mas sem adição de nitrogênio.

O processo de estresse nutricional foi realizado em câmara de cultura com fotoperíodo de 12 horas e iluminação de  $391,89 \mu\text{mol fot\acute{o}ns.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , a partir do primeiro ponto da fase estacionária com adição de todos os nutrientes do meio com biocomposto sem o nitrato (deprivação  $\text{N}_2$ ). A interrupção dos ensaios ocorreu 3 dias após essas adições seguindo o mesmo processo de concentração da biomassa algácea.

#### 4.5 ANÁLISE DE LIPÍDIOS POR MÉTODOS GRAVIMÉTRICOS

Lipídios são substâncias estruturalmente muito diversas, compreendendo ácidos graxos e esteróis, por exemplo. Não há uma reação química universal que possa ser aplicada a todos os lipídios (o que viabilizaria sua determinação por espectrofotometria). Assim, a obtenção da fração de lipídios é feita por métodos de extração física e química, com consequente pesagem do material. Isso é viável pela existência de uma característica comum a todos os lipídios: seu caráter hidrofóbico. Uma das metodologias mais utilizadas no mundo para determinação dos lipídios totais em microalgas foi desenvolvida por Folch *et. al.* (1957), outra metodologia mais simplificada e com menor demanda de solventes foi adaptada por Bligh e Dyer (1959) a partir da metodologia de Folch *et. al.* (1957).

#### 4.6 ANÁLISE DE LIPÍDIOS POR ESPECTROFOTOMETRIA

Mishra *et. al.* (2014) utilizou com sucesso o método colorimétrico de Fosfovanilina (SPV) para a medição quantitativa direta de lipídios dentro da cultura líquida de microalgas. A SPV reage com os lipídios para produzir uma cor rosa distinta, e sua intensidade pode ser quantificada usando métodos espectrofotométricos medindo a absorbância a 530 nm. Este método foi utilizado para uma rápida quantificação do conteúdo de lipídios intracelulares em *Chlorella sp.*, *Monoraphidium sp.*, *Ettlia sp.* e *Nannochloropsis sp.*, Todos os quais apresentaram teores lipídicos

variando entre 10% e 30%. A análise subsequente da biomassa usando a cromatografia em fase gasosa confirmou que o protocolo é muito exato ( $R^2 = 0.99$ ).

#### 4.7 ANÁLISE DE DADOS

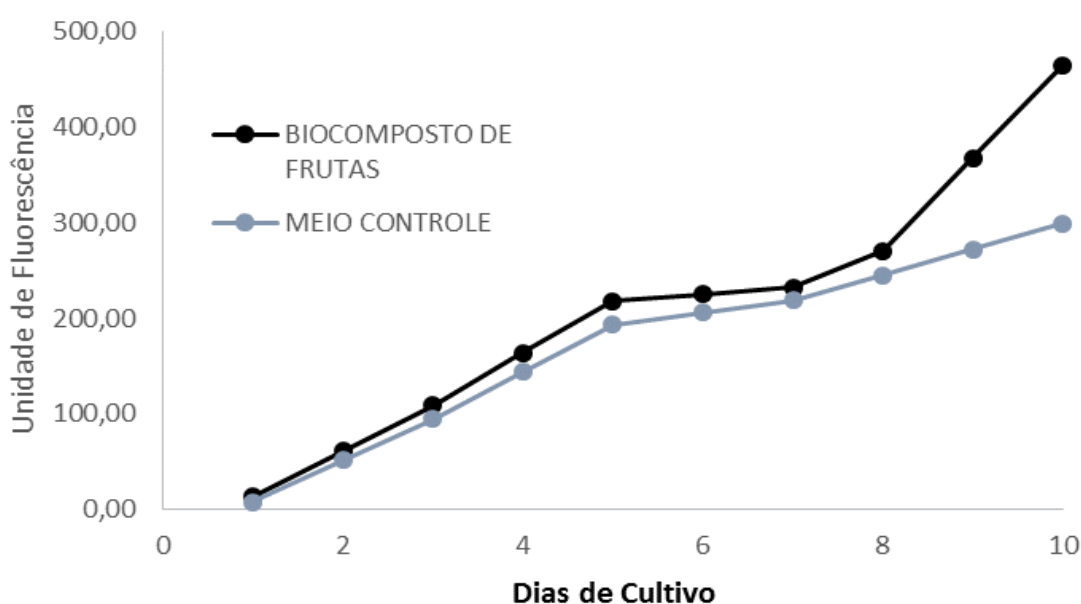
Todos os dados obtidos para cada análise foram submetidos a tratamento estatístico utilizando o programa GraphPad Prism 7.03, os resultados foram expressos na forma de média  $\pm$  desvio padrão utilizando-se análise de variância Two Way (ANOVA) e teste de Tukey para identificar diferenças significativas entre as médias ( $p > 0.50$ ).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CURVA DE CRESCIMENTO CELULAR POR ANÁLISE DE FLUORESCÊNCIA

Os cultivos sem aplicação de estresse nutricional tiveram duração de sete dias, alcançando valor de 218,75 UF para o cultivo em meio controle e 232,66 UF em meio alternativo. Os cultivos com aplicação de estresse nutricional foram iniciados no sétimo dia e interrompidos no primeiro ponto da fase estacionária dos cultivos em meio controle, obtendo valores de 299,0 UF para o cultivo em meio controle e 465,0 UF para o cultivo em meio alternativo.

Como pode ser observado na curva de fluorescência (Figura 6), os cultivos sem aplicação de estresse apresentaram crescimento satisfatório, sendo o maior crescimento apresentado pelo cultivo em meio alternativo. Após a aplicação do estresse nutricional, o cultivo em meio alternativo apresentou 65% a mais de crescimento em relação ao cultivo em meio controle. Como o intuito foi avaliar o experimento nas quatro condições, os cultivos foram interrompidos simultaneamente no décimo dia como especificado no item 4.2



**Figura 6:** Curvas de crescimento celular da espécie estudada em biotocomposto hortifrúti e meio controle.

No dia da interrupção observou-se que os cultivos em meio sintético estavam na fase estacionária de crescimento celular e provavelmente atingindo o desenvolvimento metabólico de nutrientes e possível produção de matéria graxa como nutriente de reserva, já que houve a deprivação do substrato utilizado para síntese e produção de nutrientes estruturais (nitrogênio). Neste mesmo dia também observou-se que a curva de crescimento celular dos cultivos em meio alternativo estava na fase log, tendo sua interrupção em um estágio de desenvolvimento fisiológico e bioquímico, onde nutrientes de reserva como lipídios apresentam acréscimo em decorrência do estresse nutricional com deprivação de nitrogênio.

## 5.2 CINÉTICA DE CRESCIMENTO CELULAR E VIABILIDADE LIPÍDICA

### 5.2.1. Parâmetros cinéticos de crescimento

Os cultivos expostos ao estresse nutricional (Tabela 1) foram os que apresentaram maior velocidade de crescimento ( $k$ ). Destes, o cultivo em meio alternativo foi o que obteve maior aumento na velocidade de crescimento, obtendo 22,5% a mais no valor de  $k$  em relação ao cultivo em meio controle que obteve 18,7%.

O rendimento máximo celular alcançou valores significativos nos experimentos em meio alternativo sem estresse nutricional ( $9,25 \text{ céls.mL}^{-1} \times 10^5$ ) e com estresse nutricional ( $14,4 \text{ céls.mL}^{-1} \times 10^5$ ).

Um estudo realizado por Ubeda *et al.* (2017), com uma espécie do mesmo gênero, *Coelastrum* cf. *pseudomicroporum* cultivada em águas residuais com duração de cultivo de 18 dias, registrou um rendimento celular de  $3,65 \text{ céls.mL}^{-1} \times 10^6$ , o que nos possibilita inferir que os cultivos em meio alternativo com aplicação de estresse nutricional favorecem uma maior produtividade em número de células/mL.

O experimento em meio sintético sem aplicação de estresse nutricional obteve baixo valor de rendimento máximo celular em relação ao experimento em meio alternativo com aplicação de estresse nutricional, assim como o valor obtido pelo experimento em meio sintético com aplicação de estresse nutricional (Tabela 1). Já o cultivo em meio sintético com aplicação de estresse nutricional foi o que



obteve o maior rendimento em biomassa dentre os tratamentos testados com 0,316g/L.

Tabela 1: Parâmetros cinéticos de crescimento celular

Parâmetros	Experimentos			
	1	2	3	4
Rmax (g/L)	0,077	0,316	0,142	0,222
<i>k</i>	20,8 ± 2,0	25,6 ± 1,1	18,6 ± 0,9	24,0 ± 3,2
Rmax (céls.mL <sup>-1</sup> x10 <sup>5</sup> )	4,38 ± 0,50	6,18 ± 0,58	9,25 ± 1,13	14,40 ± 2,34

Parâmetros: ***k***: velocidade de crescimento/dia. **Rmax (céls.mL<sup>-1</sup>x10<sup>5</sup>)**: Rendimento máximo celular. **Rmax (g/L)**: Rendimento máximo em biomassa. Experimentos: **1.** Cultivo em meio sintético sem aplicação de estresse nutricional; **2.** Cultivo em meio sintético com aplicação de estresse nutricional; **3.** Cultivo em meio alternativo sem aplicação de estresse; **4.** Cultivo em meio alternativo com aplicação de estresse.

Valores maiores em outras condições de cultivo de forma alternativa foram encontrados por Vidyashankar *et al.* (2013), que registrou 0,71g/L para *Coelastrum asteroidum* cultivada com uma tolerância de até 2% de CO<sub>2</sub>.

Os resultados obtidos neste trabalho evidenciam a importância da busca por meios de cultivo alternativos, de forma a baratear o processo da obtenção da biomassa microalgal a ser direcionado para futuras aplicações de acordo com suas potencialidades.

Considerando-se a fase metabólica de desenvolvimento estrutural e bioquímico em que o experimento em biocomposto com aplicação de estresse nutricional foi interrompido, supõe-se que até a fase estacionária de crescimento celular o cultivo alcançaria rendimentos maiores em biomassa.

### 5.2.2 Produtividade lipídica

Como se observa na Tabela 2, as metodologias utilizadas não diferiram significativamente entre si em relação às quatro condições de cultivo após aplicação de tratamento estatístico (Tukey, *f*= 51.9 e *p*= 0,0113). Já em relação ao tratamento estatístico Two Way entre as metodologias foi possível observar uma diferença

significativa entre *Mishra et al. (2014)* ( $p= 0,0474$ ) e Bligh e Dyer (1959) ( $p= 0,7129$ ) no cultivo em meio sintético sem aplicação de estresse nutricional.

Os valores encontrados pelas metodologias gravimétricas de Folch *et al.* (1957) e Bligh e Dyer (1959) foram maiores em relação à análise por espectrofotometria *Mishra et al. (2014)*. As análises gravimétricas apresentaram valores maiores de desvio padrão em relação a análise espectrofotométrica. Estas observações evidenciam uma maior exatidão para a determinação de lipídios de microalgas por meio de espectrofotometria.

Considerando o rendimento lipídico a metodologia de Folch *et al.* (1957) apresentou um aumento médio de 4g/100g de lipídios e a metodologia de Bligh e Dyer (1959) um aumento médio de 5g/100g para os cultivos em meio alternativo e 3g/100g para os cultivos em situação de estresse nutricional.

Sabe-se que as metodologias gravimétricas de determinação de lipídios em microalgas quantificam juntamente a matéria graxa outros constituintes solúveis em solventes clorofórmio:metanol (2:1) como a clorofila, componente presente em quantidades relativamente altas para a espécie em estudo por pertencer ao filo *Chlorophyta*. Estes fatos atentam para a possibilidade de aumentos substanciais nos valores obtidos por análises gravimétricas.

Tabela 2: Produtividade lipídica da microalga *Coelastrum cambricum* através dos métodos de Folch *et al.* (1957); Bligh e Dyer (1959) e *Mishra et al. (2014)*

Metodologias	Experimentos			
	1	2	3	4
Folch <i>et al.</i> (1957)	7,7 ± 1,5	11,7 ± 3,1	9,3 ± 5,5	9,0 ± 3,5
Bligh & Dyer (1959)	9,1 ± 3,0	12,0 ± 0,8	6,8 ± 1,9	8,5 ± 0,0
<i>Mishra et al. (2014)</i>	3,7 ± 1,4*	7,0 ± 0,7	6,1 ± 1,1	6,6 ± 0,1

Parâmetros: **k**: nº de duplicações celulares/dia. **Rmax**: Rendimento máximo. Experimentos: **1**. Cultivo em meio sintético sem aplicação de estresse nutricional; **2**. Cultivo em meio sintético com aplicação de estresse nutricional; **3**. Cultivo em meio alternativo sem aplicação de estresse; **4**. Cultivo em meio alternativo com aplicação de estresse. \*diferença significativa entre Bligh e Dyer (1959) e *Mishra et al. (2014)* para  $p<0,05$ , considerando o teste ANOVA two-way.

Dados similares foram reportados por Vidyashankar *et al.* (2013), obteve 15,27% de lipídios para a *Coelastrum asteroidum* com uma tolerância de até 2% de CO<sub>2</sub> utilizando metodologia de Folch *et al.* (1957).

Comparando com a soja, Teixeira e Morais (2007) encontraram quantidades de óleo próximas ou superiores em Clorofíceas como a *Scenedesmus obliquus* (12-14%), *Scenedesmus dimorphus* (16-40%), *Chlamydomonas reinhardtii* (21%), *Chlorella vulgaris* (14-22%), *Spirogyra sp.* (11-21%).

## 6 CONCLUSÕES

A utilização de meios de cultivo alternativos aos meios sintéticos tradicionalmente aplicados na produção de microalgas, como o biocomposto vegetal obtido na EMPASA-PB com grande demanda de resíduos frutícolas e hortícolas, é satisfatória para o desenvolvimento fisiológico e bioquímico celular da *C. cambricum*, além de otimizar o rendimento em biomassa microalgal do cultivo desta espécie.

A aplicação de estresse nutricional no cultivo da *C. cambricum* foi um processo satisfatório para otimização do rendimento em biomassa e velocidade de crescimento celular, sendo um método de grande importância para a otimização de tempo em cultivos da *C. cambricum*.

A produtividade lipídica da espécie citada em situações normais de cultivo é pequena, porém, o aumento nos teores lipídicos dessa espécie foi possível através da aplicação de meios de cultivo alternativo e em estresse nutricional com deprivação de nitrogênio. Sendo assim, dois métodos promissores para a redução de custos e produção sustentável de biomassa microalgal e matéria graxa através da clorofícea *C. cambricum*.

Os três métodos de extração lipídica analisados são viáveis para a análise e acompanhamento de cultivos. Os valores substancialmente maiores encontrados através das metodologias gravimétricas indicam a necessidade de estudos mais detalhados quanto a quantificação de compostos além de matéria graxa, como a clorofila.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

- AARONSON, S.; BERNER, T.; DUBINSKY, Z. **Microalgae as a source of chemicals and natural products**. In: Algae biomass. Elsevier. North Holand: Biomedical Press, p. 576-601. 1980.
- ÁLVAREZ-SALGADO, X. A. et. al. Control of lipophilic shellfish poisoning outbreaks by seasonal upwelling and continental runoff. **Harmful Algae**, v. 10, n. 2, p. 121-129, 2011.
- AMBROSI, M. A.; REINEHR, C. O.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M. Propriedades de Saúde de Spirulina spp. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n. 2, p. 109-117, 2008.
- ANDRADE, F.S.; SANTOS, F.A.; NASCIMENTO, I.A. **Bioprospecção de microalgas como matéria-prima para bioenergia**. Anais do VII Workshop Nacional em Bioenergia Salvador, BA, 21 e 22 de novembro de 2013.
- ANDRADE; M.R.; COSTA, J.A.V. Cultivo da microalga *spirulina platensis* em fontes alternativas de nutrientes. **Ciência e Agrotecnologia**, v.32, n.5, p. 1551-1556, 2008.
- BENEMANN, J. R.; TILLET, D.M.; WEISSMAN, J. C. **Microalgae biotechnology**. Trends in Biotechnology, v. 5, n. 2, p. 47-53, 1987.
- BERTOLDI, F. C.; SANT'ANNA, E.; OLIVEIRA, J. L. B. REVISÃO: BIOTECNOLOGIA. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 26, n. 1, 2008.
- BOROWITZKA, M. A. Economic evaluation of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal of Biotechnology**, v.70, n. 3, p. 313-321, 1999b.
- BOROWITZKA, M. A. **Economic evaluation of microalgal process and products**. In: COHEN, Z., ed. Chemicals from microalgae. London: Taylor Francis, London, p. 387-409, 1999a.
- BOUTERFAS, R.; BELKOURA, M.; DAUTA, A. The effects of irradiance and photoperiod on the growth rate of three freshwater green algae isolated from a eutrophic lake. **Limnetica**, Espanha, v. 25, n. 3, p. 647-656, 2006.
- CHAUMONT, D. Biotechnology of algalbiomass production: a review of sistemas for outdoor mass culture. **Journal of Applied Phycology**, v. 5, n. 6, p. 593-604, 1993.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. **Trends in biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 126-131, 2008.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology**, v.25, p. 294–306, 2007.

COLLA, L. M. et. al. Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. **Bioresource technology**, v. 98, n. 7, p. 1489-1493, 2007.

CONVERTI, A. et. al. Cultivation of *Spirulina platensis* in a combined airlift-tubular reactor system. **Biochemical Engineering Journal**, v. 32, n. 1, p. 13-18, 2006.

DARLEY, W. M. **Algal Biology: a physical approach**. In: WILKINSON, J. F. (ed.) Basic Microbiology. v. 9, Blackwell Scientific Publications, p. 30-52, 1982.

DASGUPTA, C.N., GILBERT, J.J., LINDBLAD, P., HEIDORN, T., BORGVANG, S.A., SKJANES, K. & DAS, D. Recent trends on the development of photobiological processes and photobioreactors for the improvement of hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.35, p.10218-10238, 2010.

DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M. DE; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v.36 n.6, p.1959-1967, 2006.

DUARTE, I. C. S. **Influência do meio nutricional no crescimento e composição centesimal de *Chlorella* sp (Chlorophyta, Chlorococcales)**. Rio Claro 2001. 148 p. Dissertações (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.

FELISBERTO, S. A.; RODRIGUES, L.; LEANDRINI, J. A. Chlorococcales registradas na comunidade periférica, no reservatório de Corumbá, Estado de Goiás, Brasil, antes e após o represamento das águas. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 23, p. 275-282, 2008.

FOLCH, J. et. al. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **J biol Chem**, v. 226, n. 1, p. 497-509, 1957.

GARDEVA, E. et. al. Cancer protective action of polysaccharide, derived from red microalga *Porphyridium cruentum*—a biological background. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 23, n. sup1, p. 783-787, 2009.

GARÓFOLO, A.; PETRILLI, A. S. Balanço entre ácidos graxos ômega-3 e 6 na resposta inflamatória em pacientes com câncer e caquexia. **Revista de Nutrição**, 2006.

GHOSH, A. et. al. Progress toward isolation of strains and genetically engineered strains of microalgae for production of biofuel and other value added chemicals: a review. **Energy Conversion and Management**, v. 113, p. 104-118, 2016.

- GONÇALVES, A. L.; PIRES, J.; SIMÕES, M. Biotechnological potential of *Synechocystis salina* co-cultures with selected microalgae and cyanobacteria: nutrients removal, biomass and lipid production. **Bioresource technology**, v. 200, p. 279-286, 2016.
- GRANGEIRO, R. V. T.; MELO, M. A. R.; SILVA, E. V.; SOUZA, A. G.; TOSCANO, I. A. S. Caracterização física, química e toxicológica da água de lavagem gerada na produção de biodiesel. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 9, n. 1, p. 78 – 83, 2014.
- GUILLARD, R. R. L.; LORENZEN, C. J. Yellow-green algae with chlorophyllide C. **Journal of Phycology**, v. 8, n. 1, p. 10-14, 1972.
- HENRIQUES, N. M.; NAVALHO, J. C.; VARELA, J.C.; CANCELA, M. L. Dunaliella: uma fonte natural de beta-caroteno com potencialidades de aproveitamento biotecnológico. **Boletim de Biotecnologia**, n. 61, p. 12-18, 1998.
- HERRERO, M; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. Sub-and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review. **Food chemistry**, v. 98, n. 1, p. 136-148, 2006.
- LAM, M. K.; LEE, K. T. Microalgae biofuels: a critical review of issues, problems and the way forward. **Biotechnology advances**, v. 30, n. 3, p. 673-690, 2012.
- LARDON, L.; HÉLIAS, A.; SIALVE, B.; STEYER, J.P.; BERNARD, O. Life cycle assessment of biodiesel production from microalgae. **Environmental Science & Technology**, v.43, n.17, p.6475–6481, 2009.
- LEE, R.E. **Phycology**. Ed. Cambridge University Press, New York, US, 4th edition, p.561, 2008.
- LOURENÇO, S. de O.; MARQUES, J. R. **Produção primária marinha**. Biologia marinha, v. 2, p. 111-154, 2002.
- LOURENÇO, S.O. **Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações**. São Carlos, Rima Editora. 2006.
- M.D. G. in G., M.D. e G, G.M. **AlgaeBase**. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 15 May 2017.
- MARTIN, C. A. *et. al.* Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: importance and occurrence in foods. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 6, p. 761-770, 2006.

MARTINS, G. B. **Efeitos da depleção de nitrogênio sobre a biomassa e produção lipídica de três espécies de microalgas fitoplanctônicas**. Dissertação do programa de pós-graduação em biologia vegetal. Universidade Federal do Espírito Santo, 2014.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renew able and Sustainable Energy Reviews**, Portugal, v.14, p.217-232, 2010.

MATSUI, M. S. et. al. Sulfated polysaccharides from red microalgae have antiinflammatory properties in vitro and in vivo. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 104, n. 1, p. 13-22, 2003.

MENDONÇA, T. A.; DRUZIAN, I. J.; NUNES, I. L. Prospecção tecnológica da utilização da *Spirulina platensis*. **Cadernos de Prospecção Tecnológica**, v.5, n.1, p.44-52, 2012.

MISHRA, R. **Welfare state capitalist society**. Routledge, 2014.

MOHEIMANI, N. R. **The culture of Coccolithophorid Algae for carbon dioxide bioremediation**. 2005. 247p. Theises (Ph. D.), Murdoch University, Australia, 2005.

NORTON, T. A.; MELKONIAN, M.; ANDERSEN, R. A. Algal Biodiversity. **Phycologia**, v. 35, n. 4, p. 308-326, 1996.

OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**, v.20, p.459-466, 2003.

ONCEL, S.; SUKAN, F. V. Comparison of two different pneumatically mixed column photobioreactors for the cultivation of *Arthrospira platensis* (*Spirulina platensis*). **Bioresource technology**, v. 99, n. 11, p. 4755-4760, 2008.

PALACIOS, O. A.; BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E. Proven and potential involvement of vitamins in interactions of plants with plant growth-promoting bacteria—an overview. **Biology and fertility of soils**, v. 50, n. 3, p. 415-432, 2014.

PELIZER, L. H.; DANESI, E. D. G. A.; SASSANO, C. E. N.; CARVALHO, J. C.M.; SATO, S.; MORAES, I. O. Influence of inoculum age and concentration in *Spirulina platensis* cultivation. **Journal of Food Engineering**, v. 56, n. 4, p. 371-375, 2003.

PÉREZ, H. E. B. **Biodiesel de Microalgas**. São Paulo: 2007.

PERINI, J. L. et. al. Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: metabolism in mammals and immune response. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 6, p. 1075-1086, 2010.

PITTMAN, J. K.; DEAN, A. P.; OSUNDEKO, O. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 17–25, 2011.

PLAZA, M. *et. al.* Screening for bioactive compounds from algae. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 51, n. 2, p. 450-455, 2010.

PLAZA, M; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. In the search of new functional food ingredients from algae. **Trends in Food Science & Technology**, v. 19, n. 1, p. 31-39, 2008.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 65, n. 6, p. 635-648, 2004.

RODOLFI L, ZITTELLI GC, BASSI N, PADOVANI G, BIONDI N, BONINI G, Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n.1, p.100–12. 2009.

SAWAENGSAK, W. *et. al.* Life cycle cost of biodiesel production from microalgae in Thailand. **Energy for Sustainable Development**, v. 18, p. 67-74, 2014.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSEN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Comercial applications of microalgae: Review. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87-96, 2006.

STEIN, J.R. **Handbook of Phycological Methods: culture methods and growth measurements.** (ed.). Cambridge: Cambridge University, 1973.

SUÁREZ, H. M. *et al.* Importância de ácidos graxos poliinsaturados presentes em peixes de cultivo e de ambiente natural para a nutrição humana. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 101-110, 2002.

TAKAGI, M.; KARSENIO, Y. T. Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells. **J. Biosciense Bioengineer**, v. 101, p. 223–226, 2006.

TEIXEIRA, C. M.; MORALES, M. E. Microalga como matéria-prima para a produção de biodiesel. **Biodiesel o novo combustível do Brasil**, Rio de Janeiro, Brasil, 2006.

TERCERO, E. A. R.; DOMENICALI, G.; BERTUCCO, A. Autotrophic production of biodiesel from microalgae: an updated process and economic analysis. **Energy**, v. 76, p. 807-815, 2014.



- TOMPKINS, J. et. al. Culture collection of algae and protozoa. **Catalogue of strains**, v. 6, 1995.
- UBEDA, B.; GALVEZ, J.A.; MICHEL, M.; BARTUAL, A. Microalgae cultivation in urban wastewater: *Coelastrum cf. pseudomicroporum* as a novel carotenoid source and a potential microalgae harvesting too. **Bioresource Technology**, v. 228, p. 210–217, 2017.
- VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. do C. E. **Algas: da economia nos ambientes aquáticos à biorremediação e a química analítica**. Química Nova, v. 27, n. 1, 2004.
- VIDYASHANKAR, S.; DEVIPRASAD, V.S.K.; CHAUHAN, G.A. RAVISHANKAR, G.A.; SARADA, R. Selection and evaluation of CO<sub>2</sub> tolerant indigenous microalga *Scenedesmus dimorphus* for unsaturated fatty acid rich lipid production under different culture conditions. **Bioresource Technology**, v.144, p.28–37, 2013.
- YUCRA, H. A.; TAPIA, P. M. El uso de microalgas como bioindicadoras de polución orgánica en Brisas de Oquendo, Callao, Perú. **Biologist (Lima)**, v. 6, p. 41-47, 2008.
- ZAHNER, H.; FIEDLER, H. P. **The need for you antibiotics: possible ways forward**. In: HUNTER, P. A.; DARBY, G. K.; RUSSEL, N. J. Fifty years of antimicrobials: past perspectives and future trends. Cambridge: In: HUNTER, P. A. DARBY, G. K.; RUSSEL, N. J. **Fifty years of antimicrobials: past perspectives and future trends**. Cambridge: University Press, 1995. p. 67-84.
- ZHU, L. Biorefinery as a promising approach to promote microalgae industry: An innovative framework. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 41, p. 1376-1384, 2015.
- ZUBIA, M. et. al. Antioxidant and antitumoural activities of some Phaeophyta from Brittany coasts. **Food Chemistry**, v. 116, n. 3, p. 693-701, 2009.